

蛍光タンパク質が関与する 発光細菌の生物発光

光の色の謎を調べる

2021年4月1日
京都光科学研究所
柄谷 肇

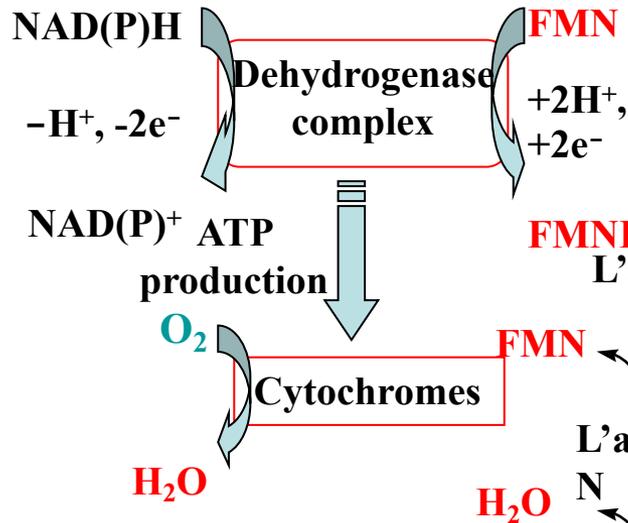
探 求

発光細菌

光の色の变化

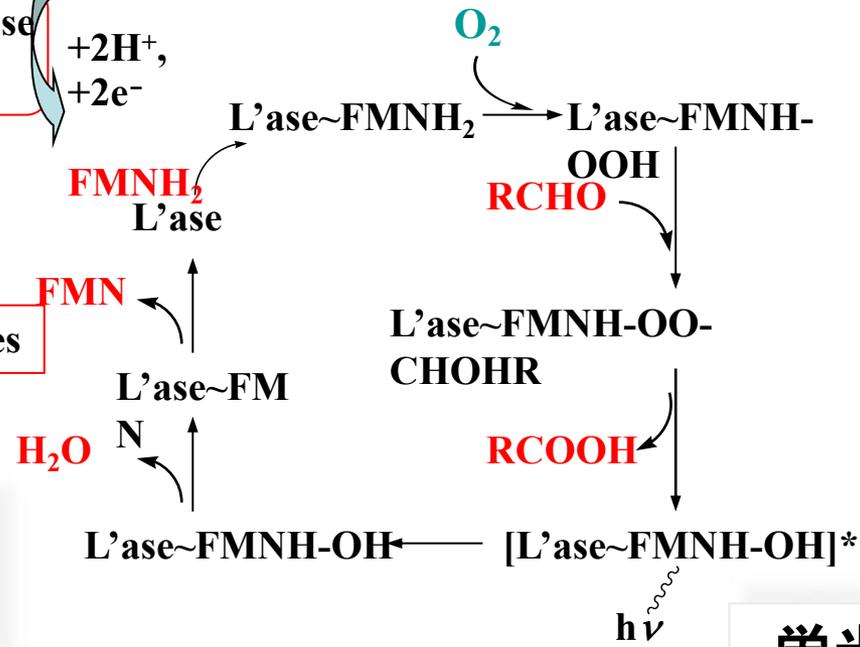
に関する研究例

Respiration

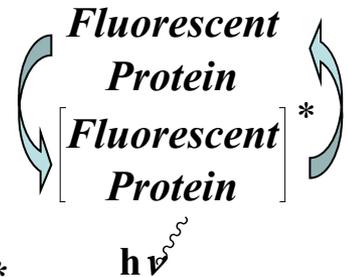


呼吸鎖 電子伝達系

発光細菌ルシフェラーゼ反応



Sensitization



蛍光タンパク質YFP 増感(発光変調)

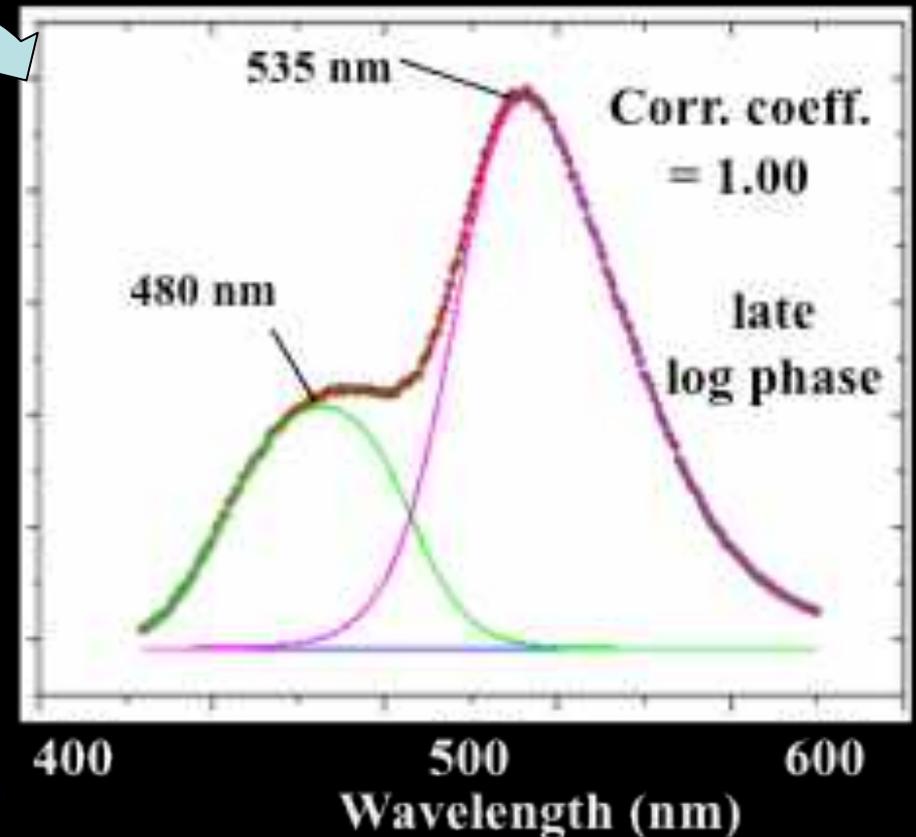
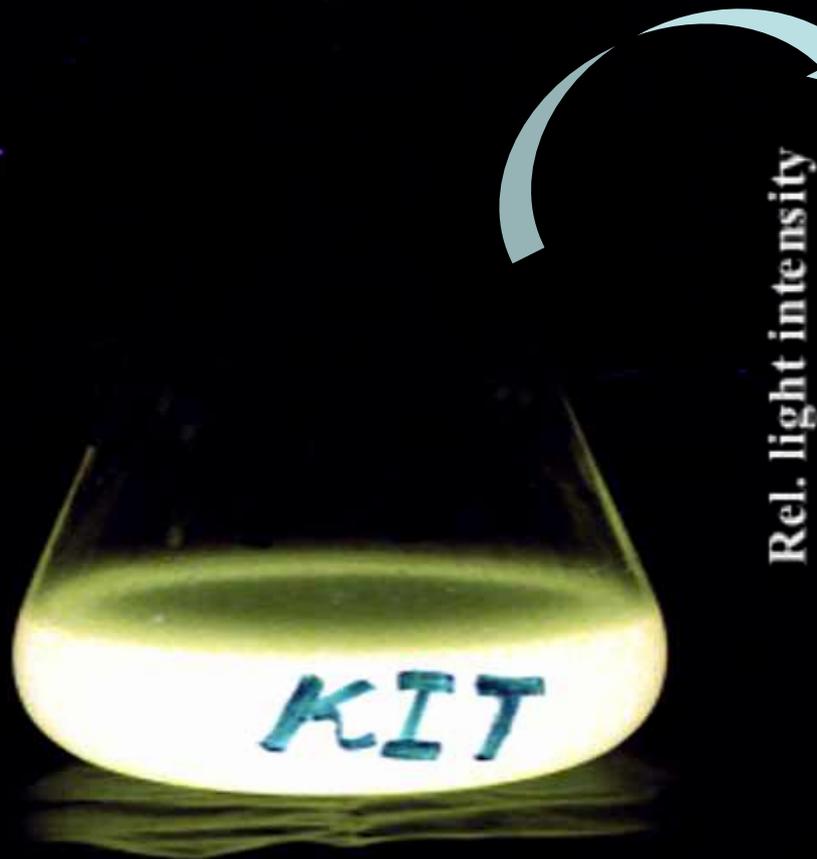
発光細菌の基本的に重要な発光メカニズムの多くは、
これまで Prof. W. Hastingsらによって調べられてきました：
ここでは発光色の変化のメカニズムに焦点を定めて調べます。

発光細菌の光の色

Aliivibrio fischeri Y1

(以前は *Vibrio fischeri* Y1と分類されていました)

生物発光スペクトルのカーブフィッティング解析



光の色の原因を探る

方策：

光るタンパク質を単離精製し、
さらに試験管で生物発光を再現する。

手法：

種々のクロマトグラフィー

電気泳動

（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリル
アミドゲル（SDS-PAGE電気泳動））

種々のスペクトロスコピー

タンパク質の精製 操作の流れ

細胞培養



細胞集菌



細胞破碎



タンパク質分画
(硫酸アンモニウム)



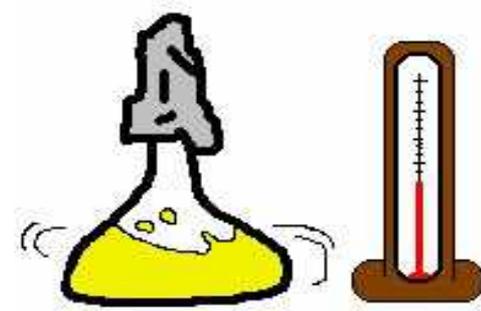
透析



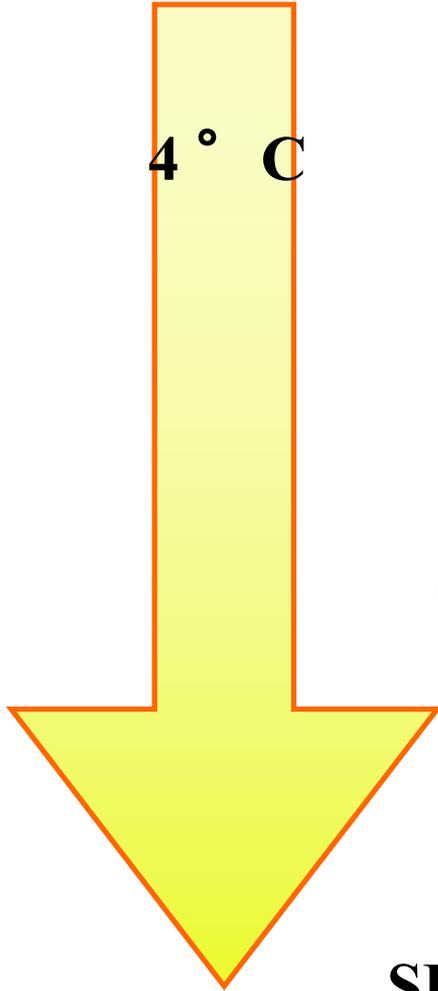
カラムクロマトグラフィー
・イオン交換
・ゲルフィルトレーション
・吸着など



SDS-ポリアクリルアミドゲル
電気泳動(純度のチェック)



4 ° C

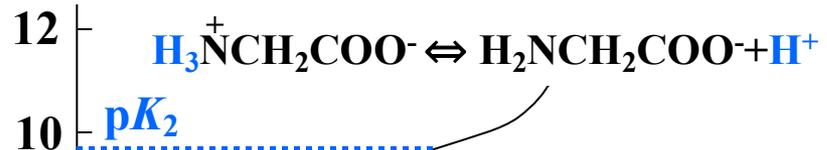


等電点 (isoelectric point, pI)

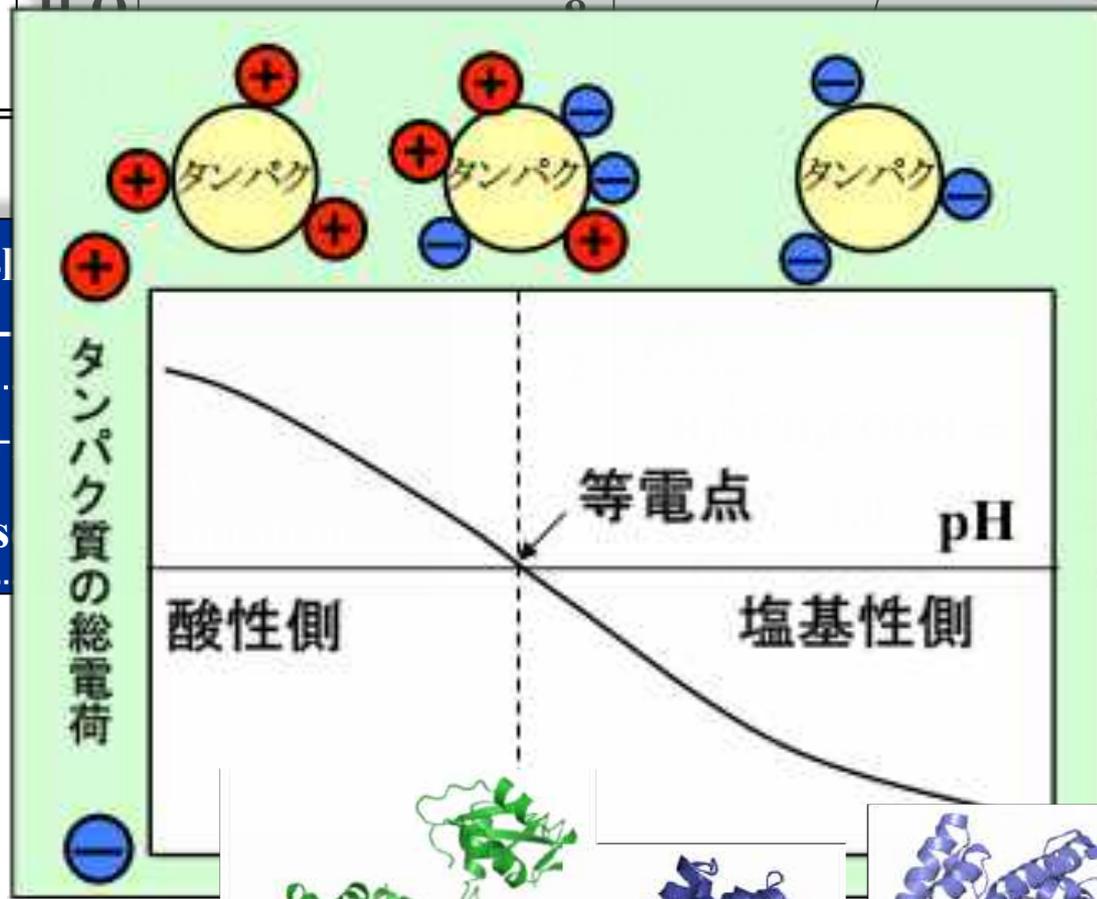


$$K = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA][H_2O]}$$

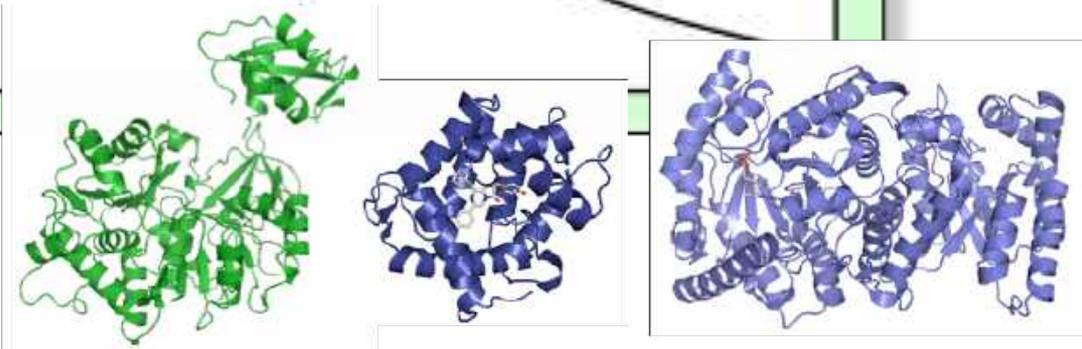
$$K_a = K [H_2O]$$

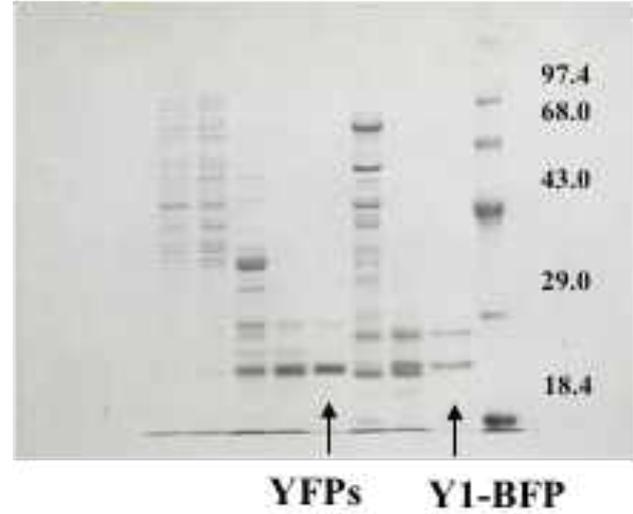
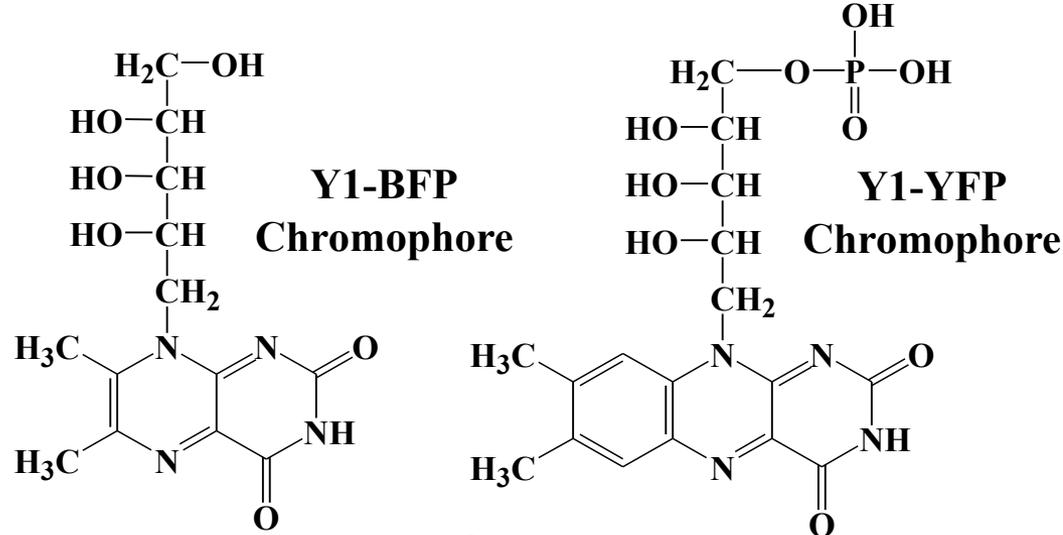


pH = -log[H⁺]
 $pK_a = -\log K_a$
 pH = pK_a + log([A⁻]/[HA])
 Henderson-Hasselbalch equation

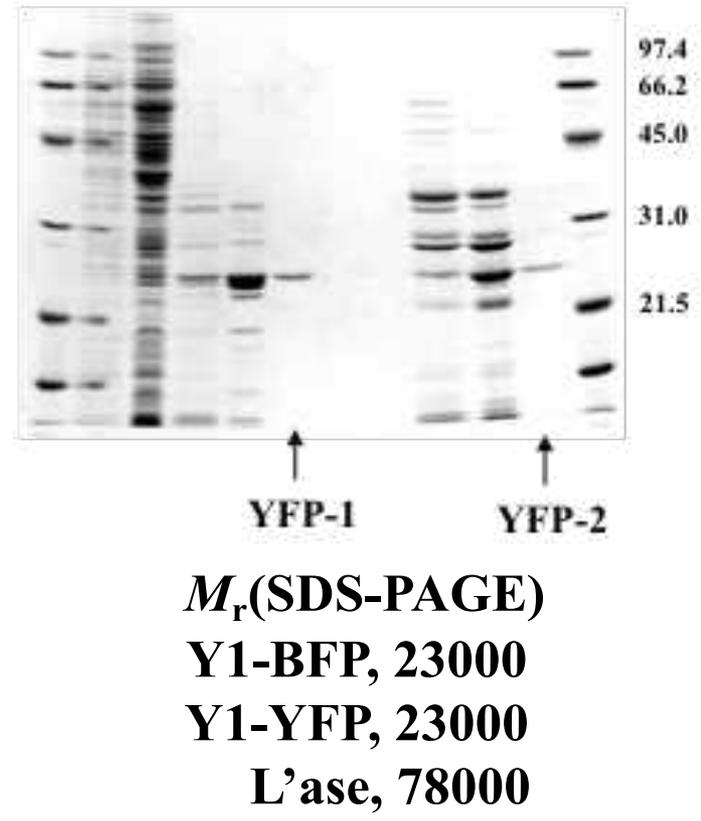
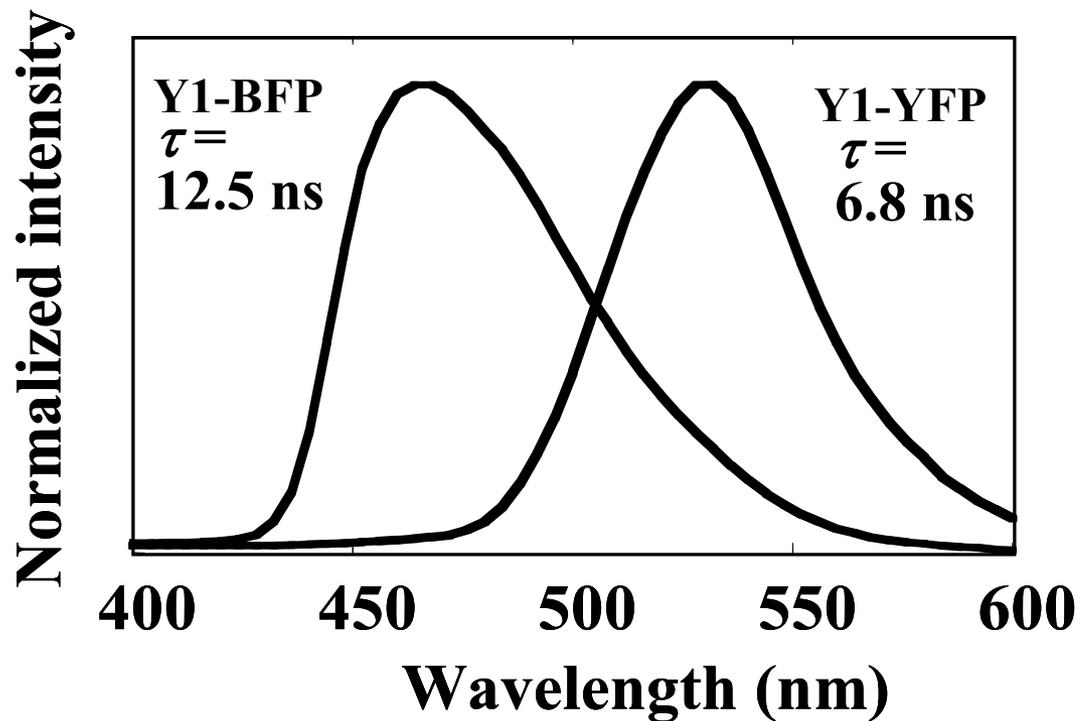


$CH_2COO^- + H^+$
 0
 valent



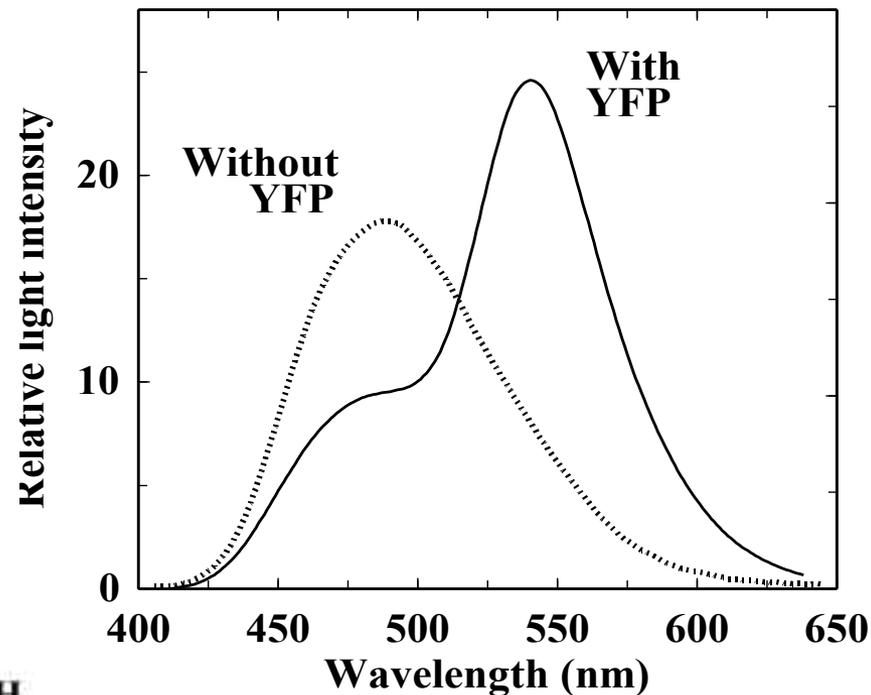
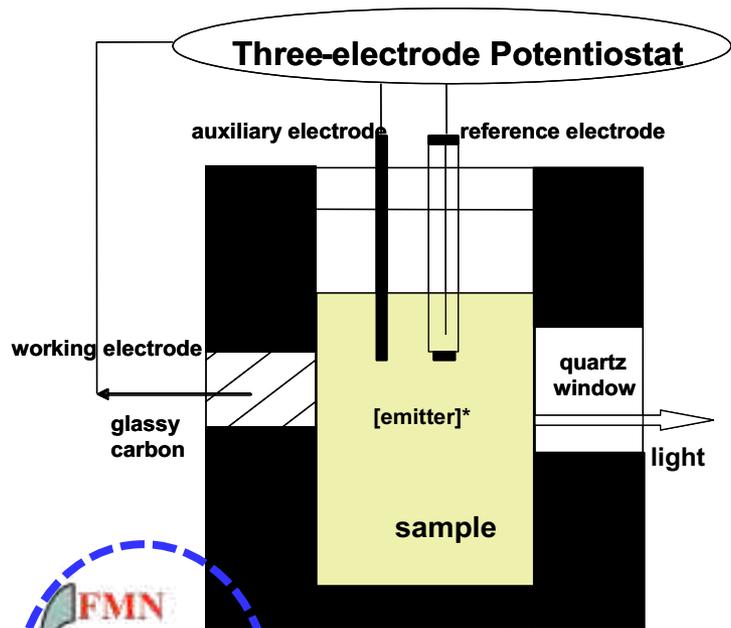


A. *fischeri* Y1より単離したY1-BFP, Y1-YFPの蛍光スペクトル及びそれぞれの蛍光団



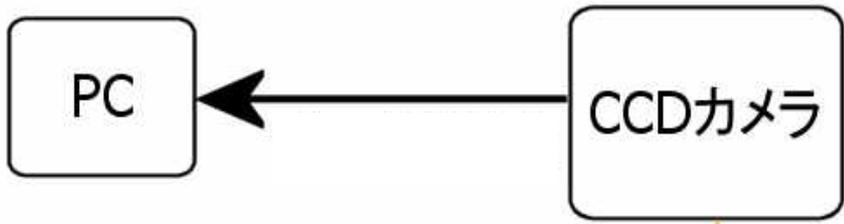
微生物発光再現

(ルシフェラーゼ触媒回路の電気化学的ON-OFFコントロール)

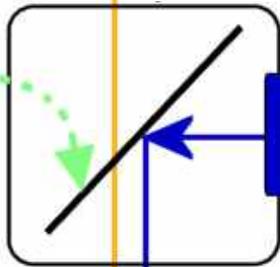
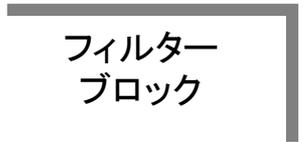


微生物発光スペクトル *in vitro*



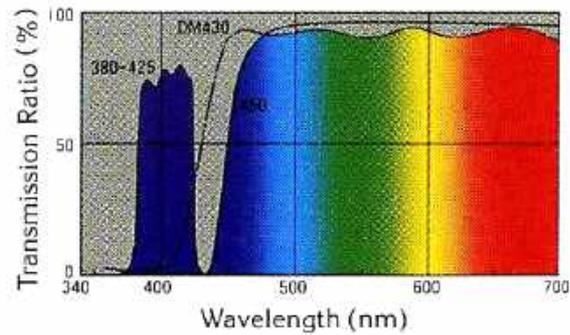
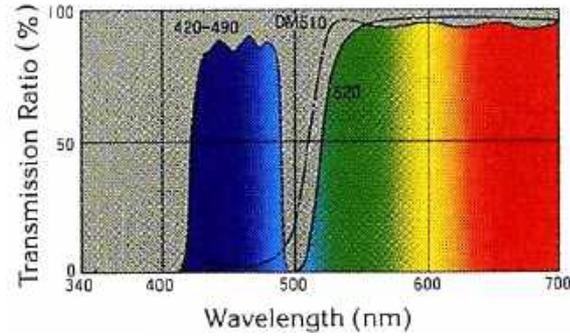
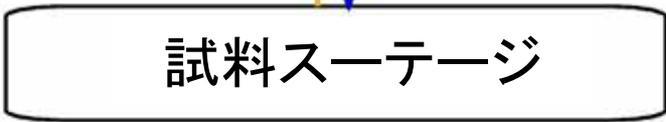


目的とする
蛍光を透過



光源からの光 励起光, 480 nm

励起光によって
生じた蛍光 励起光



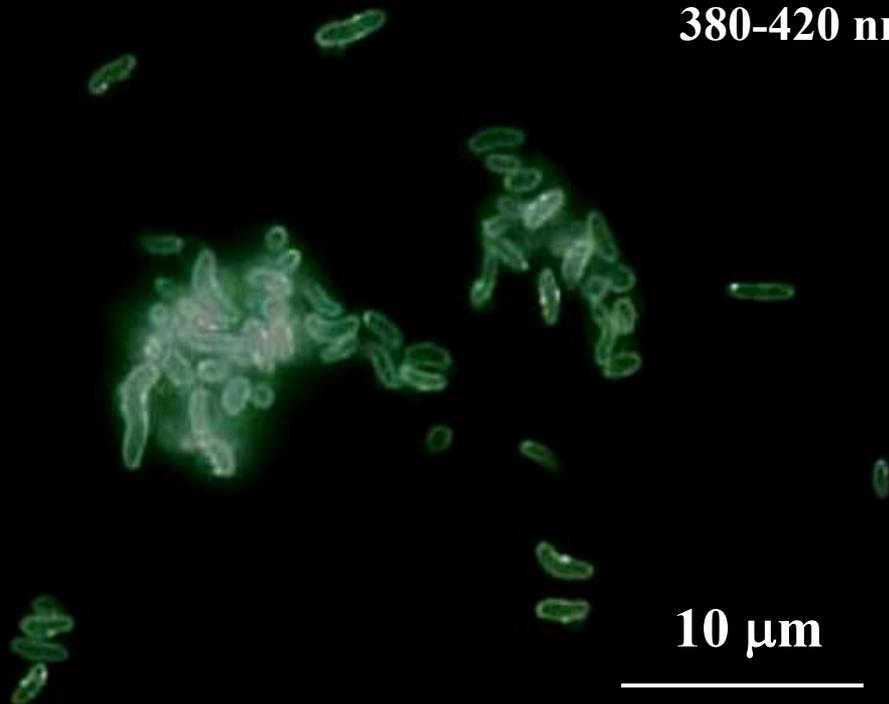
B-2A
EX 450-490
DM 505
BA 520

**蛍光顕微鏡
光学系**

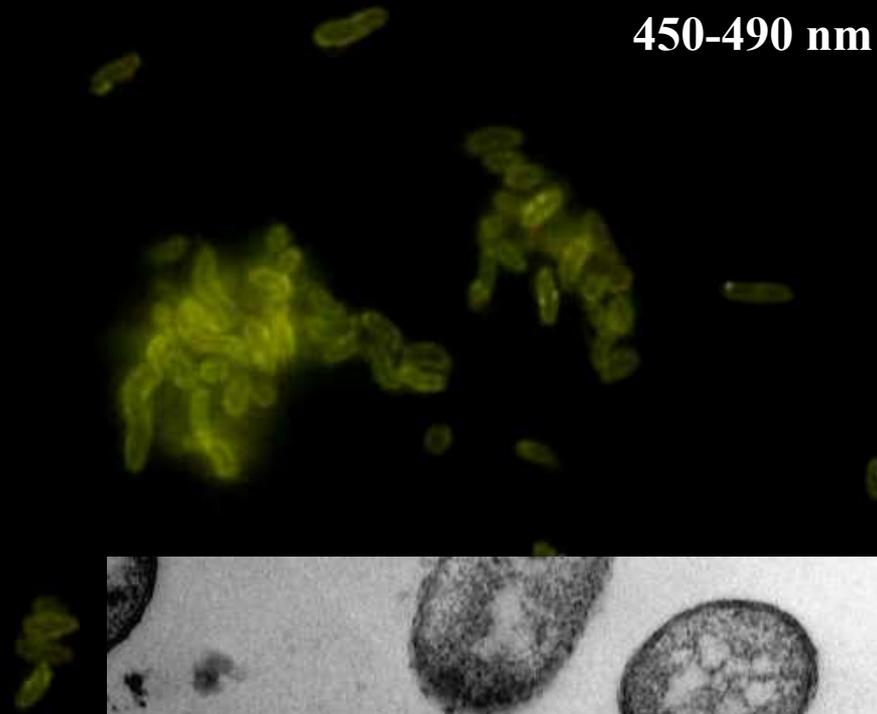
励起光, 405 nm

Real color fluorescence images of living *A. fischeri* Y1 cells

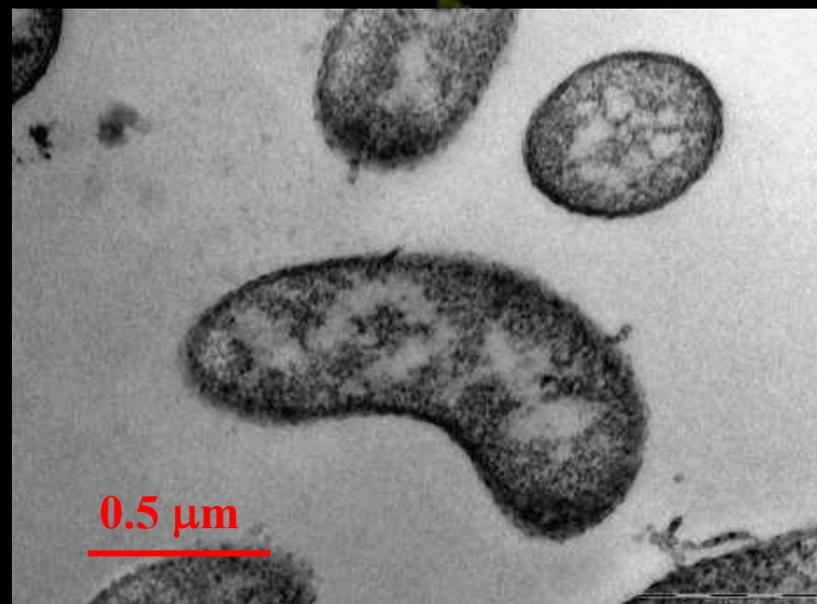
Exciter,
380-420 nm



Exciter,
450-490 nm

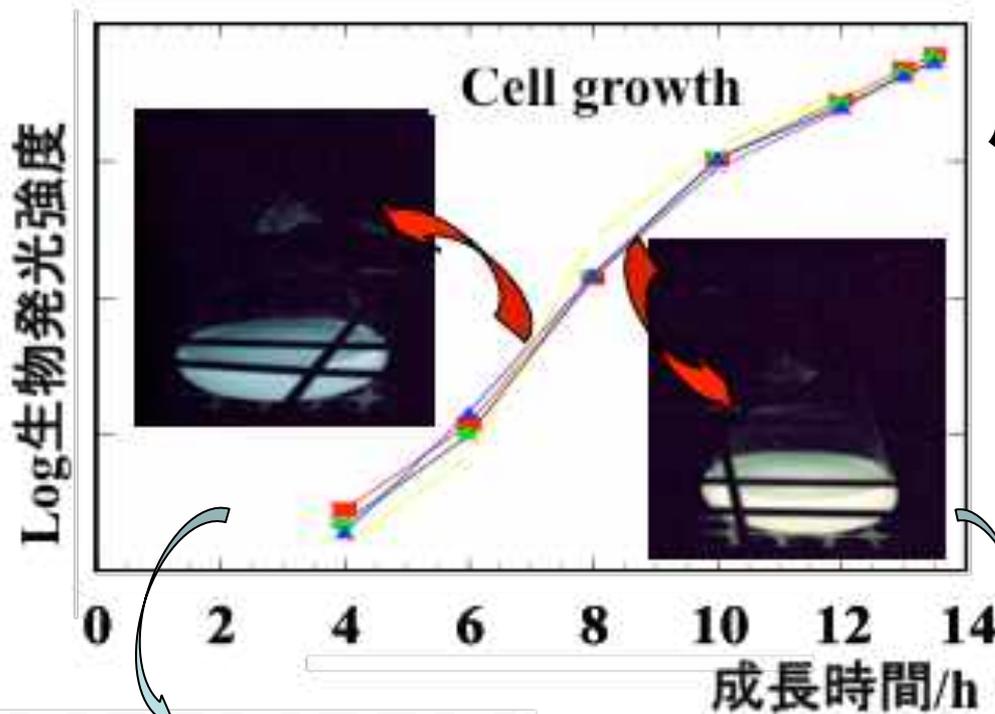


Nikon Fluorescence microscope Eclipse
E600W with a Keyence Color CCD VB-
600:Objective (CFI Plan APO 100 × (oil)).

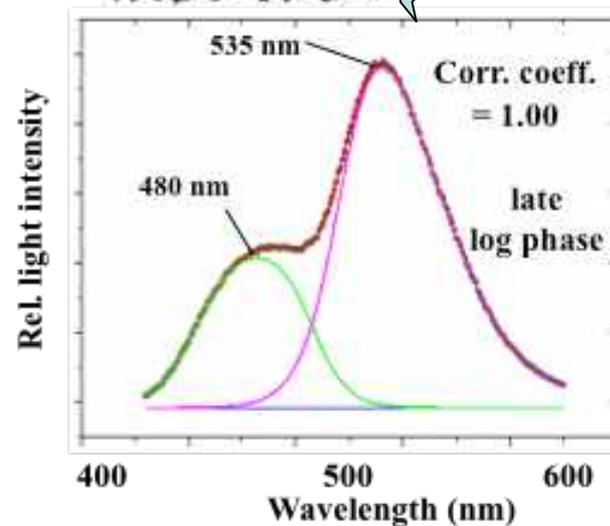
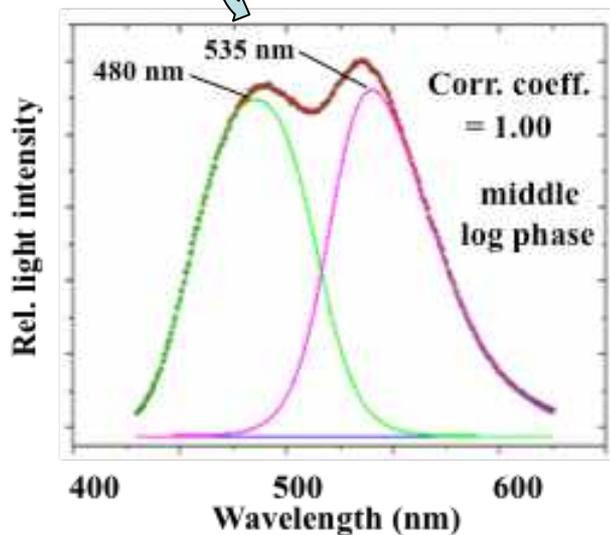


TEM image of *A. fischeri* Y1 cells

成長過程における 光の色の変化をとらえる



成長曲線



光の色の変化の解析

方策：

**増殖過程におけるY1-YFP, Y1-BFP,
L'ase(ルシフェラーゼ)の細胞内含量を
詳しく調べる**

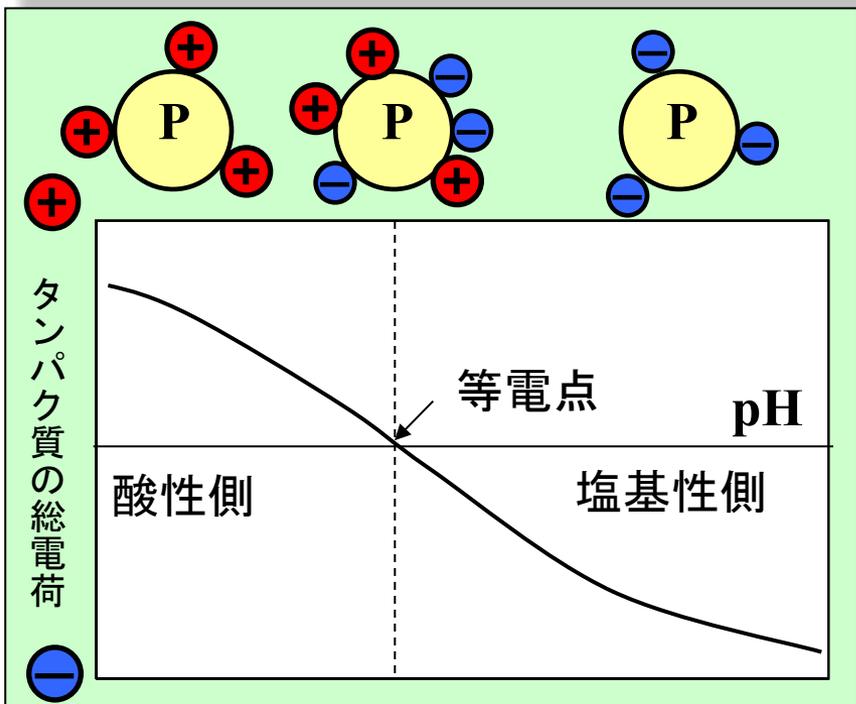
手法：

2次元電気泳動法

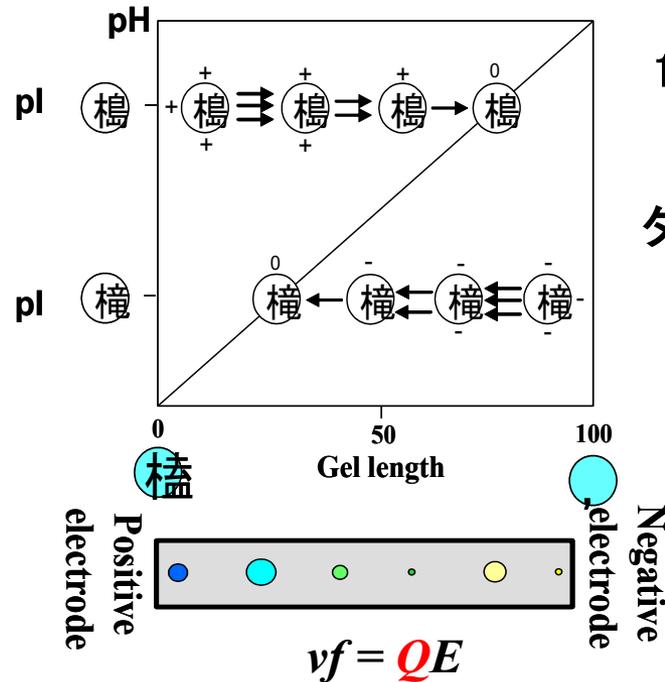
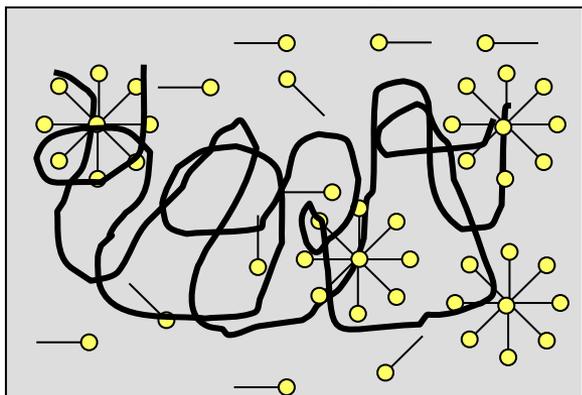
ウエスタンブロット法

種々のスペクトロスコピー

2次元電気泳動法

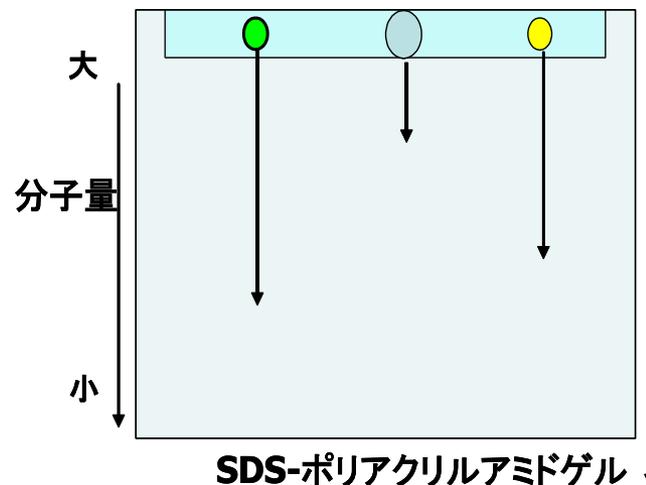


ドデシル硫酸ナトリウム
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$



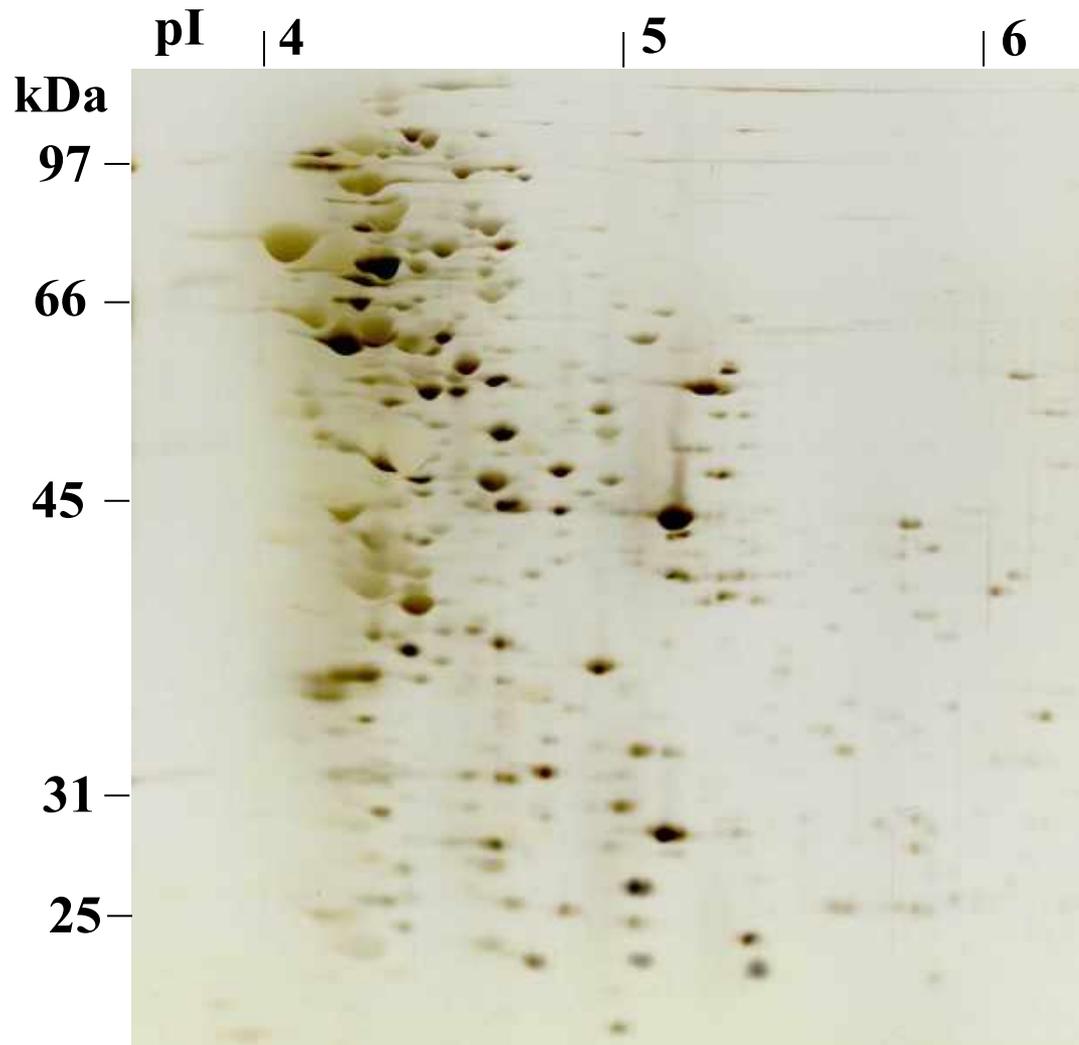
1次元目: 等電点電気泳動 (電位勾配)
 タンパクの等電点の違いによって分離

1次元目泳動方向



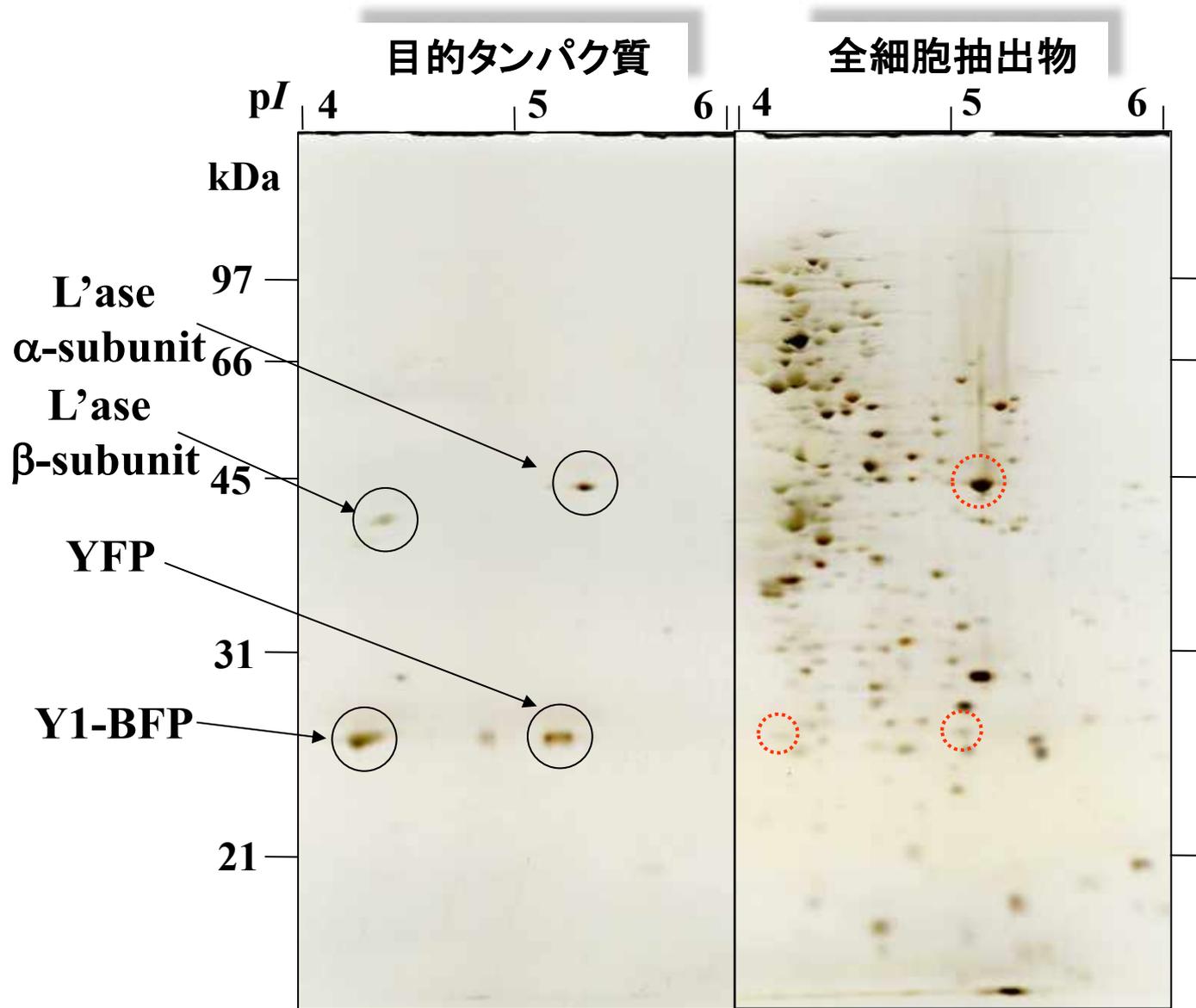
2次元目: SDS-PAGE

タンパクの分子量の違いによって分離

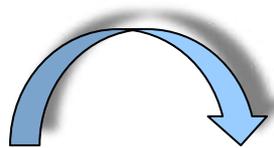


対数増殖期 *A. fischeri* Y1の細胞抽出タンパク質の二次元電気泳動パターン

目的タンパク質スポットの同定

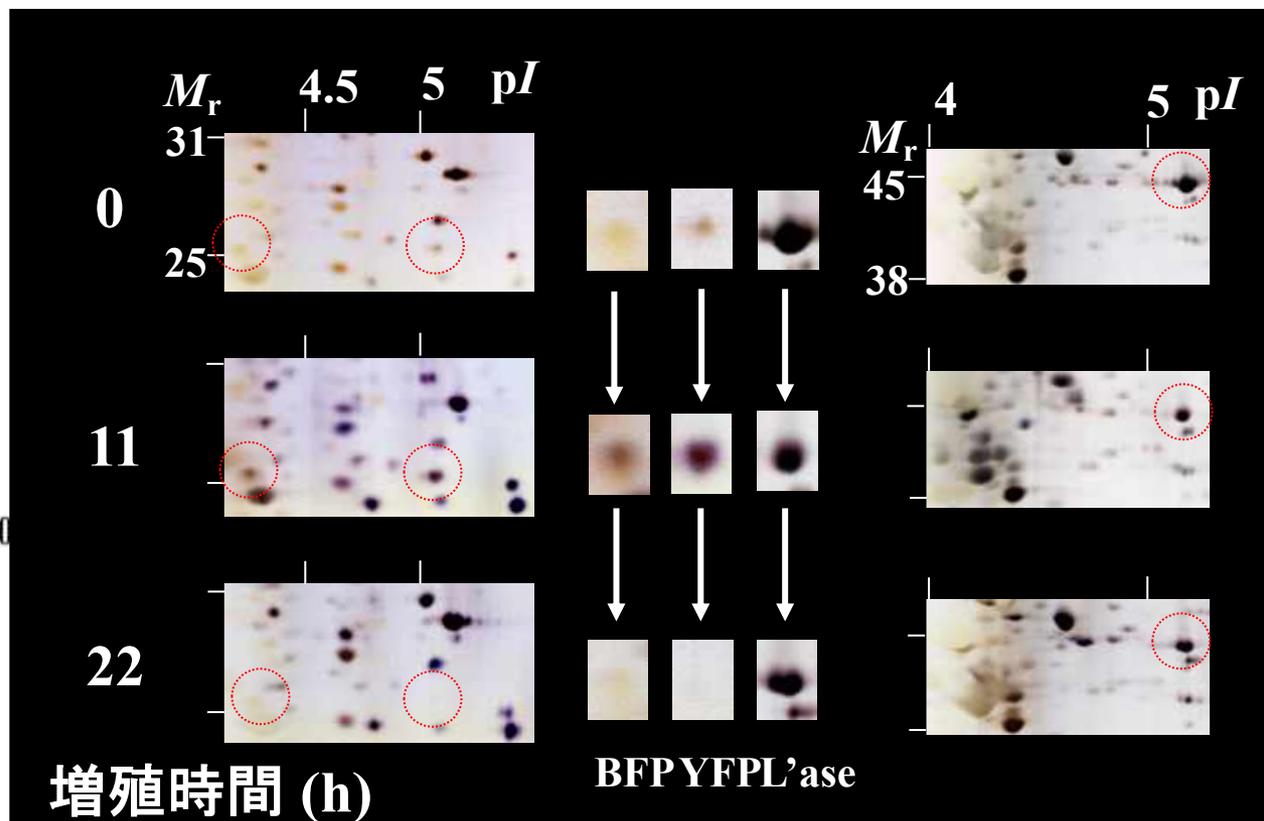
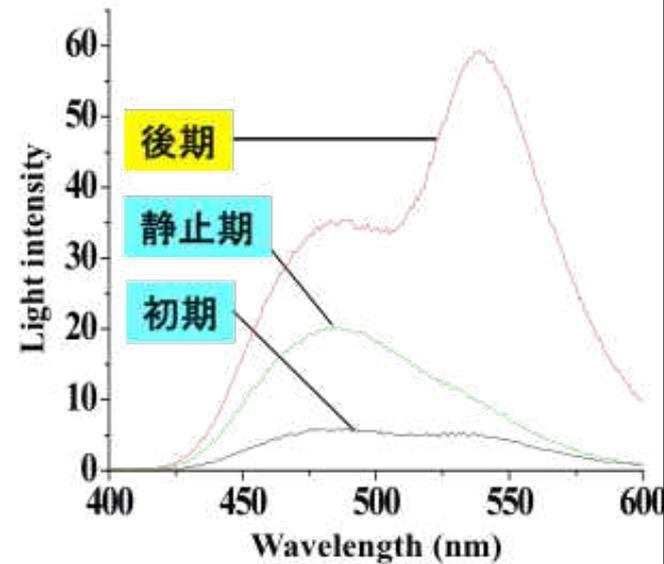


	pI
L'ase α-subunit	5.3
L'ase β-subunit	4.3
YFP	5.2
Y1-BFP	4.2



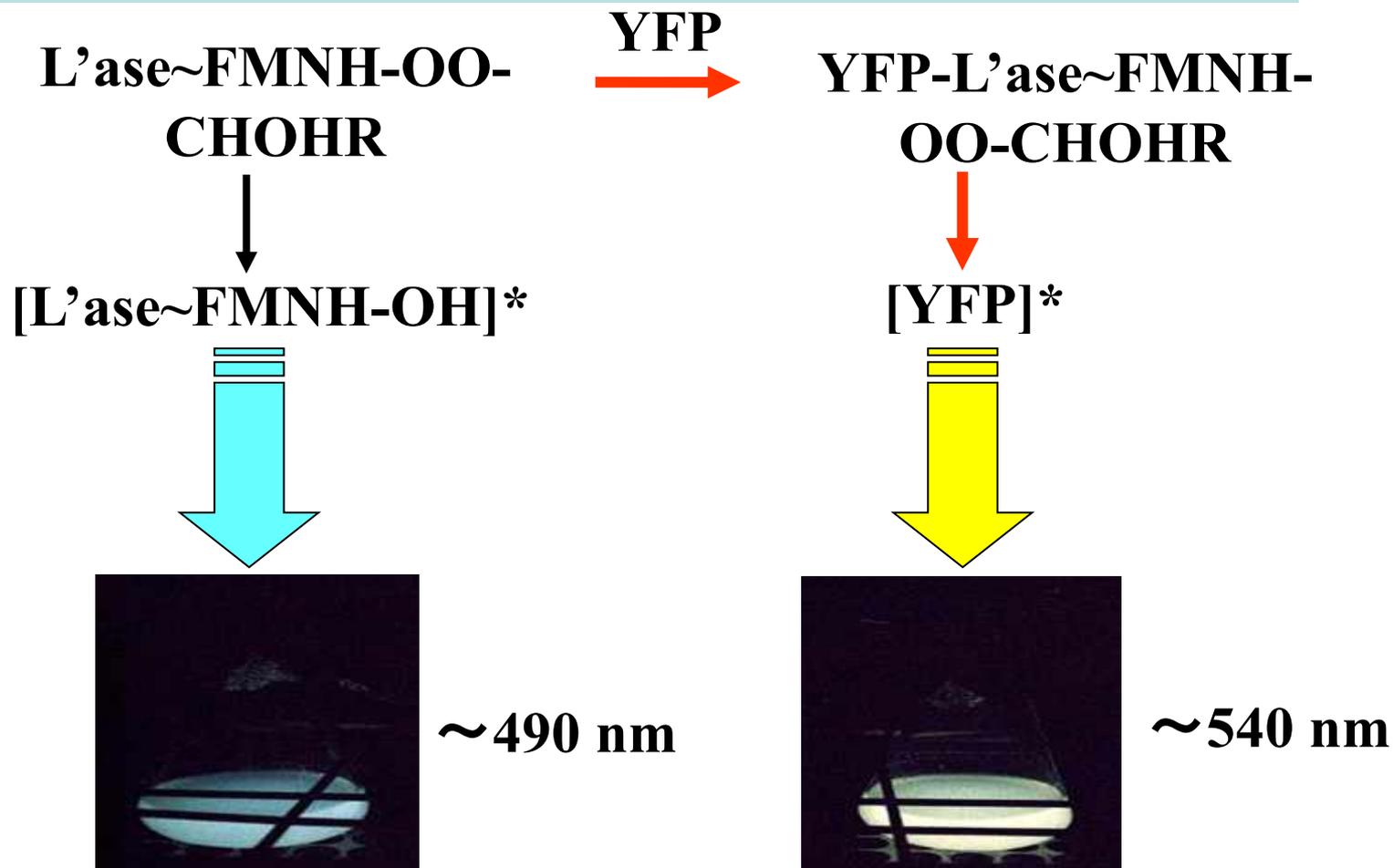
Y1-BFP Y1-YFP

ルシフェラーゼ

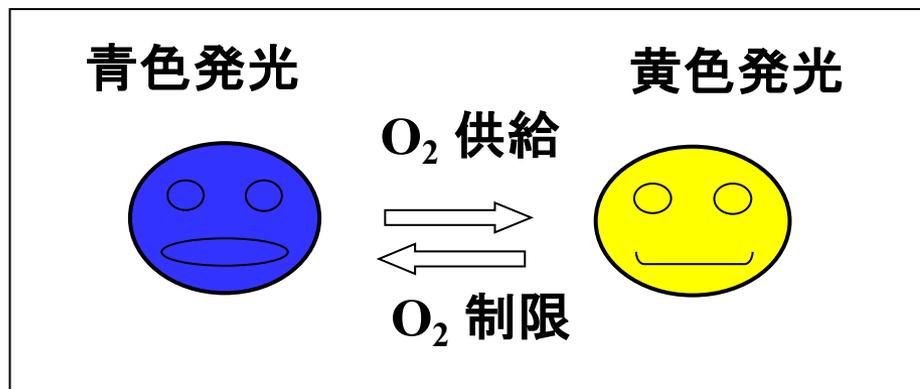
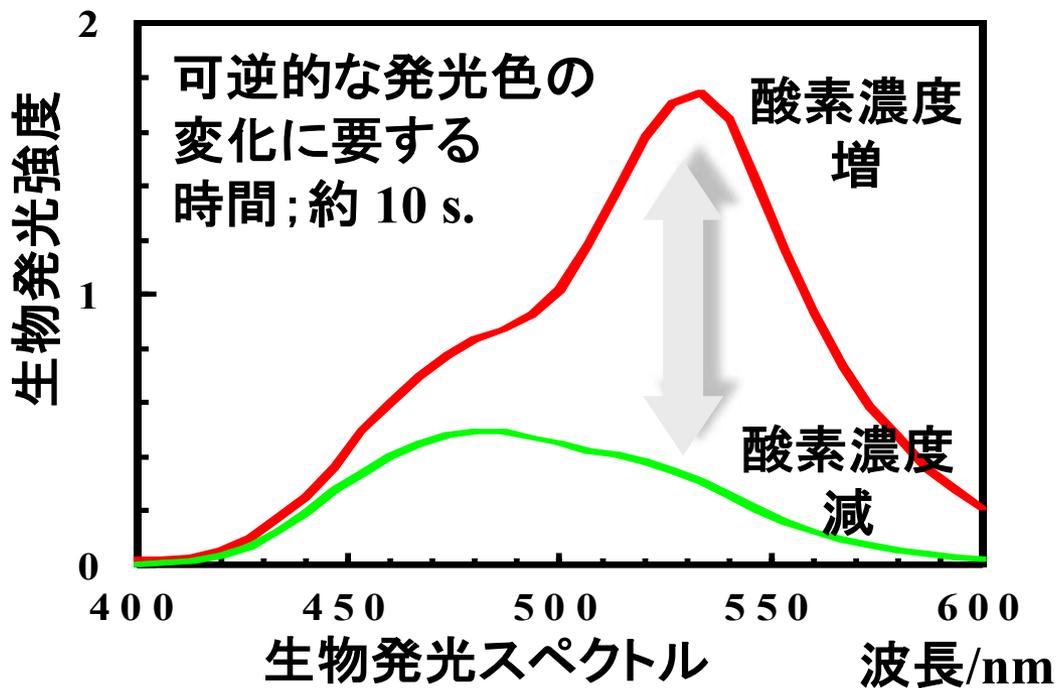
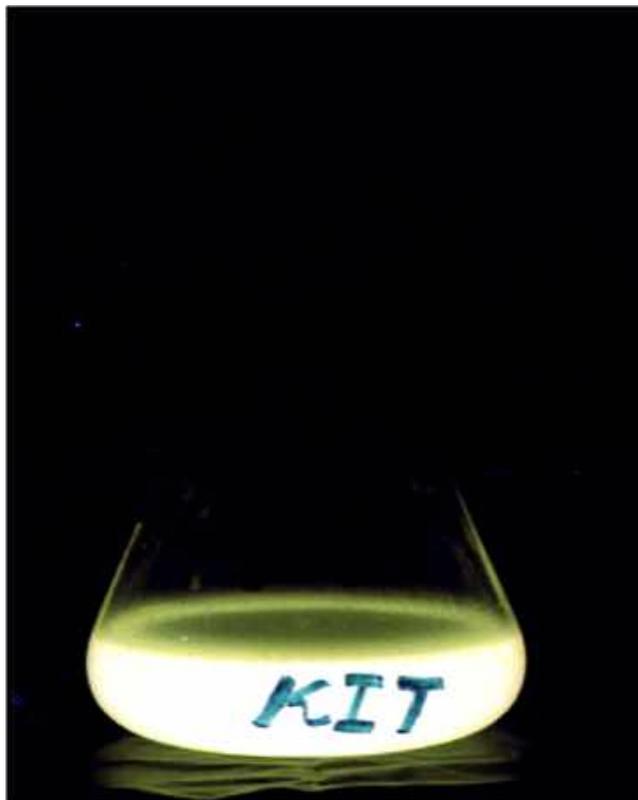


成長過程における*A. fischeri* Y1の光の色の変化

細胞内ルシフェラーゼ含量 → 一定
細胞内YFP含量 → 増加



酸素濃度の変化に依存する 光の色の変化をとらえる



**Prof. Hastings研究室のメンバーの
過去の研究成果を基にして、
上に述べましたように、光の色の
変化のメカニズムを調べる
ことができました。**

**また呼吸と光の色の変化について
も仮説を立てることができました。**